(19)日本國特許庁 (JP) (12) 公 表 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公表番号 特表平7-502723

**	2 22	gpag.	48	•	区分

(43)公表日 平成7年(1995)3月23日

(51) Int,Cl,*	識別記号	疗内整理器务	FI					
COFK 14/79	•	8318-4H						
A 6 1 K 38/10	3							
C12N 5/10)							
		8314-4C	A 6	1 K	37/ 14			
		9050 - 4 B	C 1	2 N	15/ 00		ZNA A	
		家能查審	未請求	予慮者	核变进术	有	(全 15 頁)	最終頁に続く
(21)出編修号	神飯平4 −505865		(71) 8	細え	₩.1	=/<-	シテイ・オブ・	・バーモント・
(86) (22)出額日	平成4年(1992) 2 /	668	1				イト・アクリオ	
(85) 翻訳文提出日	平成5年(1993)85	96 E	i		カレツ	9		
(not FRANCISES ALE	DOT CITE OO	(00000	1		240		164 or . T. 1. L L	Non ton or II

(86)国際出版番号 PCT/US92/00928 (87)国際公開番号 WO92/13550 (87) 国際公開日 平成4年(1992)8月20日 (31)優先編主張番号 652,869

(32) 選先日 1991年2月8日 (93)優先報主張国 米国 (US) EP(AT. BE. CH. DE. (81) 指定図 DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, N

L. SE), CA, JP

アメリカ合衆国バーモント州05405パーリ

ントン (番地なし) (71)出職人 ユニバーシテイ・オブ・プリティツシユコ

> ロンピア カナダ国ブイ 6 テイ 1 ダブリユー5・ブ リティツシュコロンピア・バンクーパー

(会地なし)

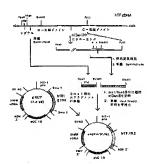
(74)代理人 弁理士 小田島 平宮

最終頁に続く

(B4) 【発明の名称】 組み替えトランスフェリン、トランスフェリンキー分子、及びそれらの突然変異体

(57)【築約1

金属-結合性が変えられた、又は他の性質を有する組 み替えトランスフェリン、トランスフェリン単一分子、 及び突然変異体トランスフェリンにつき記載する。組み 替えトランスフェリン分子は組み替え分子をコードする 発現ベクターを用いて形質転換されたベビーハムスター 腎臓細胞などの安定な真核細胞系により繊維的形態で発 現される。組み替えトランスフェリンは金属の過剰貧荷 に苦しむ患者において過剰の毒性金属を結合して除去す る金属キレート化治機に用いることができる。



増まめ底原

- 1 切み除えトランスフェリン。
- 2、悩み替えヒト協議トランスフェリン。
- 3、事なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属へ転合ドメイン を含む、トランスフェリンの粒み替えギー分子。
- 4. 1個の実出型がおり血液トランスフェリンのアミノ来構造出版であ る、旗水の総勝8に記載のトランスフェリンギー分子。
- 5、 3 傷の突出質がヒト前滑トランスフェリンのカルボキシ末端突出部
- である、胸外の範囲なに紅蜘のトランスフェリン半ー分子。 6、少なくともトランスフェリンの支援の突我部の金属へ結合ギメイン を含み、実然緊緊外の企構に対する場合力が天然のキランスフェリンよ
- り続い、気然変異はトランスフェリンギー分子。 7、軽に対する場合力が天然のトランスフェリンより強い、誘攻の転服

Rに解釈の認敢を整体トランスフェリンボー分子。

- 8. 少なくともトランスフェリンの1世の突地駆の金頭一指会ドメイン を含み、灰米のトランスフェリンの位置206のリシン状態がゲルタミ ンにより構築されている。原文の転配了に記載の突然変異体トランスフェ
- 9、トランスフェリン、又は少なくともトランスフェリンの1個の提出 死の社会ドメインを全むトランスフェリンギー分子をコードする拡散を、 異常に地中の発揮に進した油漆的調心要素と結合させて含む複数機能物 **歩立む、直接を取べクター。**
- 10、放散模類物がトランスフェリン叉はトランスフェリン単一分不多 コードせるお願い飲食したトランスフェリンシケテル配列をコードする

祖み替えトランスフェリン、トランスフェリン半=分字、及びそれらの **李秋季男体**

我助の背着

リンギー会子。

- 単金的にトランスフェリン又はシデロフィリンと呼ばれる数一筋合プ リメドグロブリンは、皆しく無ねの物能を有するタンパク質の確期を含 む。ヒトラクトフェリン (Anderson, B. F. <u>et al</u>. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1769−1773) 及びウナギ加坡トランスフェリン (Balley. S. e. al (1988) Biochemistry 27:58 () 4 = 5 8 1 2)の以一線然展学的分析は、これらのタンパク質が振い 関稿 ペデチドにより連続された 2 使の類似した完出那を含み、各実出部 は金属イオン及び共動アニオンのための総合報道を含む準に繋け回を緩 選する2別のドメインを含むことも明らかにしている。 ニワトリオポトランスフェリン直転子が影賞軽強マウス中で発現され
- (McKnight, G. 5 *1 a). (1983) Cell (C ambrldge, MA) <u>34</u>:335-341)、ラットトランスフェ リンホー塾とガラクトシダーゼの融合タンパク質が<u>E.coli</u>中で発 Quant (Aldred, A el 21. (1984) Bioche m. 8: 9 p h v. Res. Commun. 122: 960-968) . この騒命とレバケ質を除る、関核系でトランスフェリン又は分子の一部 を影響する旅名は不成功であった(Aldred A. A. A.C. al.

お表平7-502723 (2)

- 協数を念む、独立の配配分に記載の異数発展ペクター。
- 1.1. 1個の製出銀がヒト申請トランスフェリンのアミノ未満発出級で ある、頭束の範囲10に記載の異単発担ベクター。
- 1.2. 1個の契急部がヒト塩漬トランスフェリンのカルボキシ末端共産
- **あである、前水の範囲まりに肥蛙の異性発現ペクター。** 1.3、トランスフェリンは一分子が支がのトランスフェリンのリシン件
- 本の代わりに位置206にグルタミン連集を含む、防水の位置9に搭載 の直接発現ペクター。 1.4. 雌味の軽割をに鉛酸のベクターを用いてトランスフェクションさ
- れた実体機能等。 15. 健康の転回9に記載のペクターを用いてトランスフェクションを
 - わたベドーハルスター管理機能を
 - 16. 少なくともトランスフェランの18の実用店の企業=お台ドナイ ンを合むトランスフェリンの組み替え等・分子を、金属の結構値を下げ るのに十分な気で患者に含ますることを含む、全質キシート化治療の方
 - 17. 金銭が終である、請求の業額18に発棄の方法。
 - 18. トランスフェリンキー分字が突然のトランスフェリンより載しく 秋と終合する実然是男外である、排水の範囲17に総戦の方法。
 - 19 トランスフェリンギー分子が交然のトランスフェリンのリシン鉄 素の代わりに位置208にグルクミン残落を含む、確求の範囲18に記 WOTE.
 - 2.0、組み替えトランスフェサンを含む相略培養味噌のための非由清極

(1984) Blochem, Blochy, Res. Commun. 122:960-965)。おそらくタンパク質の流差に回旋状の構造 及び分子内の多数のジスルフィド級権がパクテリア指立中の典額に対す る主要な味むであろう。アルカリホスファナービングテル配列を付けて クンパク質をパクテリア機能进に向かわせることにより、気熱のタンパ ク側の折り長み理論を終分的に長小にする結らは不成功であった。

- 米発明は組み替えトランスフェリン、少なくともトランスフェリンの 1 四の英出稿(アミノー京城又はカルヴキシー本幣)の众領一結合ドナ インを奔む減み替えとランスフェリンは一分子、及びトランスフェリン の発視のための実定な昭時性要素に削する。肌み替えトランスフェサン 以来企业影響を表すれた長津田原、例えばベビーハムスター発展開発中 与えることができる。木花明は艾、天然(野庄一説)の別郷のトランス フェリンと異なる金属=約合性又は他の包製を存する疾患疾患はトラン スフェリンをびょうンスフェリンは一分子に関する。これらには秋又は 此の会属への結合が天地のトランスフェリンより思しいかあるいは様々 かである姿態電製体トランスフェリン及びトランスフェリン等へ分子が Arro.
- トランスフェサンボー分子は全国運動要素は立は金属中者にかかった 患者の処理のための金属キレート化治療に使用することができる。例え ばトランスフェリンギー分子、特に矢状のトランスフェリンより激しく 鉄と貼合する突然変異体をサラセミアなどの鉄=過剰負荷原若に扱与し、 その体から感謝の奇性の秋を除去することができる。さらにキー分子又

け金属メオン選択機が変えられたその実体変異体を思いて始め間を金属。 利えは緑、水螺、カダミウム、柳又は斑粒を体から発生することができる。

回の説明

図2は、種々のベビーハムスター野際関係不からの免疫技能物のウェスターンフェットを介す。 えー 世界状態を終めための地域を含まっト (4) 及び取役(b) の成場を伝ーカで子芸術得を用いて定義させた。 分類回したベレットの歌劇を作るDodSO。 P P G E E により発し、 ムトロマルロースには、 ボートで子芸術展及びその娘ファルビリネスファ ター・料金板でよる名がいて食金させた。内GH一ヶ川リエカのカア・アメリューのNVT地球を多りのよめのドイスやで変化し、DMEM / 10 句々の処理の集件でサイマの機能を培養した。191、3日代を配け、2月、30日~9月17トランスフェジシンBH代版性。6月、日下ドバミーカリロアトランスフェジシンBH代版性。分子裏マーカー(エ10**)の企業をグラットの会に示い、通知のルスフ、000のテンジンディンの業まグロットの会に示け、(200、2000年のアンジンディンの業まグロットの会に示け、そので

図3は5十下/2回の形態及びPAGRの触を集ま、 (パネル4) 48 **み替えりてF/3別(上来)及びタンパク質の網接借りTF/2N(〒** 柳)のPolyanion Siのカラム上におけるFPLC地域。 (パネルB) 分子音解束 (Mr円) 及びパネルムからのピークョー d.c. #ScronaDodSO.-PAGE (909A72FDE-196 勾配)。(パネルC)FPLCピークェーは(組み替えトTFノ2N乗) 及びパネルれからのピークセート(タンパク機分解誘導トTF/2 N強) の許確元条件でにおけるウレアーデえると。アポッタンパタ質(Boo) 及び執一結合タンパク質(Fe)の位置を示す。 デタしじて用いられた 条件は材料及び方法にてボナ。FPLC切分は以下のように基めた:ビ ークモ (部分23-27)、ピークち (28-31)、ピーテェ (32 -38), K-9d (39-45), K-9* (28-31), K-9 「 (32-26)、ピータロ (38-44) 及びピークト(46-51)。 図4は10mMのFo(iii)(NTA)。を用いた主要形態の細 み替えhTF/2Nの前定を示す。タンパク質の最後1、00mLの1 OmM NaHCO)中の3、68A284単位であった。職気技体単級な 秋寺それぞれ仰えた鉄5~10分階両視スペクトルを走来した。

思り知るがおいすアグタルの特別を外れてサンルを明す。(a) 2月20日インプロードニングを用いなフェリスを表えてりた。(b) 4月20日インプロードニングスプロC・4.0, MS=68800は がひる回路型スペクトか(convolution differen ce spacirum)。タンパラ及び相目"時,0中00, 1M K C1 0. ImLeで記載されるた。

図らはホードー下yではみがえれてア/2ドウザア株販実施スペクトルを乗り、図は16日にのラインプロードニング、NS=2、000 を見いたフーリュ実施を示す。クンパク裏が対域「N,0中の0、1M KCI 0 1 mL中でもngでかり、こまなは*H,0中の0、1Mの 足フッを始めてかった。

発用の単独な数例

本表明は抱み対えトランスフェリン、組み替えトランスフェリン等・ 引事、及び実体のトランスフェリン母子を除掉して金属-最合権の限止 など、後輩が実化した金一長トランスフェリン及びトランスフェリン - 分子の肉肉支質な今年も、組み替えトランスフェリンは大概に、数 び皮質が止倒する(地)の 影響で指面することができる。 例えばしい 温度トラウスフェダンの場合性スポー分学は、他のも「油温タンパク質 を実施的に含まない場合的に再び合社はている場合である。 対面的にもロータンパク質のタンパク質の解はより物理をおれば一分学 分類がいる間で、深刻にセトラタンスフェリンのカルボャレー系統等の シンパク質がある発はよりを担て指することはできない。 却と他 人地は、トランスフェリンのが規密の対象が必要により、地と他 人地は、トランスフェリンの表現が認めの対象が提高に欠拡度時間を を使わることに関係といる。

一般に本来駅の組み替えトランスフェリンは、トランスフェリンショ ~ドする球酸液要物を用いて悪した核室地程をトランスフェクションし、 とランスフェクション協立総防を発薬に適した条件下で増集し、耐炉に より発現された組み替えトランスフェリンを巫衣することにより製造さ れる。5種類のトランスフェリンのブミノ敵配列が報告された(1ヵ1 tach, J. -M. and Chambon, P. (1982) Eu r. J. Biochem. 122: 291-295: MacGilli vray, R T. A. st al. (1983) J. Biol. Ch em. 258:3543-3553:Mets-Boutigue, M. -M. et al. (1984) Eur. J. Biochem. 145 : 659-676 : Rose, T. M. et al. (1986) Pr oc. Nati. Acad. 3el. USA 83:1261-126 5: Baldwin, G. S. and Weinstock, J. (I 988) Nucleic Acids, Res. 16:8720-87 39)。とと血清トランスフェサンのONA配列が表定された(Yan g. P. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. S.

もランスフェリンなびトリンスフェリン県一分子の政治資業等を、他 五度のの保証資料をの確認力が起こより記事することができる。T a リコマ 2 = 1 = (1985) Meric Laic Acid T a リコマ 2 = 1 = (1985) Meric Laic Acid T a の1(h) M. (1989) Meric Acid T acid T

7 L / 東韓田山県

カルポキシ朱埃天出郎

外の開発ウェドする。これにより、トランスフェアリットといれた指数 合作本に実施さい。1、5 mm)のメトトレキセートがで急速を買けるも 上が可能になり、ジェドロホレートレジクターでの不足したを登場的な 気の必定を定する。pHUではpUC1を実施取別も合か、それに2 りまがUTで<u>S。Coll</u>leで機能なに実質性機能かトランスファク レッシのとかに大手型を乗りまります。1

・ランスフェリンペラードする むりれる 全点を打開べたプーは、著して を注除物に作品を入る。 計算しい電気が出し、ペラテーを研究して を指導力、環境的に活動のトランスフェラン提出のを実現する実施な解 放送を多くなっとかってきままが確かである。 我に目前とは認めて、ドー ルフェー開始報じるも、パピーへルステー機能が起こり、トンスフェリ ルフェードする DAA (集団からかイラナー(機)はおりじりなく を行ってトランスフェアンコンされ、最初のに基立なトランスフェアン ので、スペルニールラー。 を把握し、分割する更好を知識を集を与えること かでさる。これから場所は関係の大規模機能にデオリースコン、であ と同様である場合となってある。 であ と同様であるが出来る。

リン他からかりム地で及びよびトラーではレーションなどの事業的方面 らない、集成的主物をベリターでトランスコメリションドランとは、 さる。その使用的を、トランスフェリンの主義で記事するかに進いた場 中下で観光する。即式ばかれりだベッターの属いでトランスフェフショ したベビーハムスター両面は他心、影会所のなぎ下で料し、トラン スフェリン海線のかれ間があったことができる。ペピーでARスー 地は、動展集団リ「Crater O"(Glbcc) 条件が交換を 地は、動展集団リ「Crater O"(Glbcc) 条件が交換を かしまったのの地位とおより、ペピートのは、フェア 12 保険料

(アミノ歌1 - :	37)	(71/88363-679)			
アスパラギン歌	6.8	アスパラギン数	392		
チロシン	9.8	サロシン	426		
チャシン	188	チロシン	519		
ヒスチジン	249	ヒスチジン	584		

他の種類のトランスフェリンの場合、番号が異なりリガンド(アミノ 脚)は日中である。

トランスフェリンの他の対解対象を対象し、これらも対応は実際の機能とはあることかできる。通常におら出版で降離したアミノ機、利息はアンレ、とオランス以下がキニンである。所名は系統のトランスフェリンより患しく彼と結合する天然文集はトランスフェリンギーの予以、20世間のインド議会でカラミンで選手することにより(AAGHC CO)配書することのでき、

トランスフェリンープリカルス。 0 NAの対象を検索するための もした関本事業を含め東は作用ペイテー中にフローニングすることので さる。序ましい環境関係ペクテービリス 1 milet (で、 R、 D、 <u>a.t.</u> ま<u>し、(1987) できた。</u> 30:4035-448とより形成された デフェドドの以でである。このプラス・1度ドナックでネク・メンテル の発音でよるがより・シンスフェリンコードの以の形式等と会か。まら にかけて114。 近端を物では中が表現する形で大きない。まら にかけて114。 近端を物では中が表現する形で大きない。まっ にかけて114。 近端を物では中が表現ではアジェルでは 研究で、ベスカからの保等产とグブラルを次にSY40所別での・フェー の場面でたるシンドでのセート・レグファーゼが世子をなり。場合予以、 性が時間変加りよりにかったというとファーゼが世子をなり。場合予以、

混合物の場地中で招募するのが好ましい。

通した協議関係のは、別項をお、分泌されたトランスフェリンを治地 かる限度することができる。 動物的機能を使いて協力がよトランズフェ リンの京等的に特定のが計画体をことができる。 1つの具体化の帯点、 場合のトランスフェリンと試を信行させ、その後アニオン契係クロマ トグラフェーにより複数する。

戦争しゃ代謝家に算るというシステェリンは、天原のトランスフェ リンより選しく他と他合する事業的意理とランフェンキー分平であ 大、成就需要がボールチの必須により、金板のより方向なかした人気 で極急が可能になる。存におさいい。成成型特計・分学は、下値の実施 所に記者をおよるもらできた。これはよりの使にリンツ付はくどか よといきまなし、ランステェリンキー分子は、ハローグンング音音を表 の手機の影響を深温し、優かに関連され、戻って金板がサント代き れるののでなくはから出まされるので資料である。さらに転換の本一分 予は複数機能の成立のトランスフェリンレセプターと認合しないので、 これらの限定は終金機造しない。さらにヒトトランスフェリンのポーツ 子はおもらくとトの体により"自己"と経躍され、減って完定学的必否 を引きたらない。

キミに突然変異体単一分子は、金属イオン金製情が関わるように設計 することができる。キレート化剤を用いて他の希性金属、何見ば編、水 傷、カドミウム、相及び重動を体から設置することができる。

キレート化地域の場合、企業をキレート化して影響度を毒性重要下に 下げるのは十分はまで図る耐えトランスフェリン未要をに扱なする。 ~ 気にこれは主要がかたかざし思るがヒッル、列えは食塩水中で、多項ロ 的理程で「現実的に仕続ける」をコナス。

扱みぎえなへ及しトリッンスフェリンは、植物が美物やのための乗血 構成気勢で保険することができる。トランスア、コリン選鹿を軽視によ も終め気に必要である。取らせるトランスフェリンの原的により、ヒト 最後から物態となりサンスフェリンにおう方実力を(形式は行り下気は好) 次ウィルス)の危険を見望することができる。

本教朝を以下の祝徳刊によりきらに囲示する。

(契約型)1. アミノーを協議的都を含むがあ替えトランスフェリンボー分子の数

4e F4

T4 DNAリガーゼ、DNAボリノラーゼミ(クレノウフラグメント)及びT4ポリスクレオチドキナーゼは、PharmaciaーPE

<u>58</u>:8389=3394) 中に補償されたとき芽味にDNAライブラ りを、血清してアのアミノー実践87ミノ肚をコードする白朮オリゴタ クレオチドキハイブリッド形成プローブとして用いてスクリーエングし to fiffy by Faring, F. et al. (1984) P. ros, Natl. Acad. Sci. USA 51:2752-27 58により報告されたカTF cDNA配列のヌクレオテド88-11 えに対応した。オリゴミクレオテドはするポリミクレオテドキナーゼ族 び¹²PーATPも思いて末端ー課載し(Chicones, G. and van de Sande, J. H. (1980) Methods Enzymol, 68: ?8-85), 約10'Engu-0325 ーエングに用いた。弾性のクローンの制限エンギスクレアーゼマッピン グ及びDNA配列分析を、それぞれかりC19及びM13mo19ペク ターを用いて機助的方法で行った(Manistis T. <u>e.</u> <u>sl</u>。 (1982) Molecular Clening, a Labora tory Manuat. Cold Spring Barbor L aboratory, Cold Spring Harbor, NY; Messing, J. (1982) Methode Enzymol. 101:20-78; Sangar, F. et al. (1977) P FOC. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-64 671.

Biochemicalsから購入した。お間ニンドスクレアーがは Pharmecia PL BlochemicalaRUBethe ada Research Laboratorieshomitte オリゴデオキシリモスクレアーゼは、Anniied Ri^^vsc ems 380A DNA会政機上で会成した。エチロセルロースフィ ルターは、Schleicher and Schuelibe, **P - 課職アクシオテドはドモw England Nuclearから、 もつが洗ったトトランスフェリンは血液は5.1.4 m.a. むりゃかしょき ! Companyから、ホルマリレー協能スクフィロロックス アウ レウス (Staphylococcus gureus)) 相類は、B cibesdo Research Laboratoriacas. プロトプロット(PFの10klcl)危袋スクリーニング接近器はP ramegaから、オリゴスクレオテドー指示(ollgonucle のしまれた一点してもとしゅんと単位を実施をかっとけるからくましょ 四から、Dulbeccoの株正必須は地及びラン発児血液はひょうc oから、及び在一とトトランスフェリンをノクローチル雑体代でドー1 44 Cseckosievskien Academy of Sci enceから再た。始の試異はすべて分析用が又はそれ以上の病院であっ

左坐

<u>Ehigh FD 222 a U r (hTF) c DNAの機能</u> Dr. Si wart Oikin. (Harvard University) 選 報は45<u>E. coll</u> 南部ペクテーBKT-218 (Prochown ik. E. V. <u>ei al.</u> (1983) J. Blot. Chem. 2

rd Mushes Medical Institute, University of Washington) の提出による。他は、
サリオタンセラドの、認知ウルとは、日本のは、
Watere Associates: Atkisson, T. and
Senith, M. (1984) <u>Olisconucleotide</u> (6
it, M. J., Ed.) pp35-81, IRU Pross. Ox
ford)。 Yayler, J. W. <u>et. al.</u> (1985) <u>Nuc</u>
Leic. Acids, Res. [2] ** 170-874 (1985) <u>Nuc</u>
Leic. Acids, Res. [2] ** 170-874 (1985) <u>Nuc</u>
W. S. <u>et.</u> [2] ** 170-874 (1985) <u>Nuc</u>
W. S. <u>et.</u> [2] ** 170-874 (1985) <u>Nuc</u>
Calamatos (198

3月末代観念・「①水のウン洗電器食さびりょり b a c e の意差 6月年後(DMEM)ので10~c m で電車でから ① 物数に成ませ ・ 機・でで40 a c 1 a . P P <u>e 1 1 1 (1943) Mol.</u> Cell、Biol <u>6</u> 1480~1483 ではあめつシ型かんかつ を向これをようり ① a a のプラスでトを用いてトランステェンションと よっと 2 4年間光・最新を100 a MO A 1 ドランステェンションと かの大便では300 A MO A 1 7 で表面に関いて高かを通用した。大田の の回転を登上、100 m 1.0 DMEM T MT 工 多数でも大田の c m*の個性をは、100 m 1.0 DMEM T MT 工 多数でも大田の ため、0 m Mの用するまで発生に成ることにより30 90 90 母素を もの、0 m Mの用するまで発生に成ることにより30 90 90 母素を もの、0 m Mの用するまで発生に成ることにより30 90 90 母素を

特表平7-502723 (合)

免疫・抗躁及びウェステーンブロッティング 週間智量暗地及び組 親ライヤートの免疫ー状体を、Van Oost. B A. et al. (3986) Bioches, Cell Bloi. 64:698-7 DEの方法により行った。北谷物をNoDodSOaの存在下における 12%をリアクリルアミドアル上の電気放動により分析し(Laemm 11. U. K. (1970) Nature (London) 227:6 89~685)、、その後ニトロセルロース値上にブロッティングした。 プロットをり、1mg/mtのゼラテンを含むPBS中でインキュベー トし、その後にウンス=6丁子抗菌病(PBS中で250一倍動物)を 用いて必要し、最後にてルカリホスファターゼー複合ウサギ族ーヒンジ しゅのはほん用い、 ほお来の株所に従って発色した。

<u>アミノ飲産地</u>. 3~フルオロチロシンを収み替えれてFノ2N中に いす NMRプローブとして挿入するためは、活動複雑に培養申16% のレーチョンン議院でで、ヒーホーフルギロラロシン(Sigma C hemical Company)を独矩した。終船はむ、しゃm=5 ルキロチョシンのない格地と開催れての特徴上でも十分に収品した。

<u>組み替えれTF/2Nの単粒。</u> 収穫した塩差塩均をフェニルメテル スルホエルフルオリド中で9.81%としてプロチアーゼを担害し、塩 他中のトランスフェリンのすべてを製物させるのに干分なFe ([i i i (NTA) sを加えた。回過で推体した後、診察を治水を洗水に対して 2.4 時間、その後が1:111-Q無製水に対して製料関連折した。後も リスーHC1級別線、pHB 4を5mMの最終準度まで加え、鉱料を でも1. が彼にも知めた。1 Calkのトリス・HC丁俊新技、p 228、 4 で単進化したDCAE-Sechacel (Pharmacia) のだ

その徐力ラムを両補配送中のNaCiの繊維勾能(G=6、3M)を 飛いて終難した。ピンク色を示す響分をNaDodSOィ= PAORに より分成し、経済財産サンバク製(貼と37、000)を会力を得る地 めた。そのような望分は、組織格養協助中のウシ始児監済からのラシト ランスアュリン及びアルブミンも含む。事物な競分をAppicon P おってのほとつちゃんに連絡した後、タンパナ関ル 100~以内別の 水車アンモニウムが平衡化したちゃのりゃくさく ウェブラ ちゅっさ rline (Pharmacia-PL Biochemicals)

ラム (2. ちょきりゃめ) に負荷した。

のカラム(2、5×90cm)上のクロマトグラフィーにかけた。 フシタンパク質からhTF/2Nを完全に分離するために、このカラ ムを通して2回目のクロマトグラフォー政府が必要な場合がある。この 疑問でも、43/ 5.44 は延然く主、 Oであり、汚染ヘムータンパク質(お まなく人でベキシン)の理察を禁している。 トエドノリルは、 SOwM のをリスーHCI、pHS. 日中のNaClの直線句配(Q~0、2M) を用いたPolyanion S1 (Pharmacla) のカラム (1 x 1 0 cm)上で1 m l /分の液量にて 1 特別かけたアタルのにより産 終的に特別して英語にした。まのもの智分を集めた。タンパク質の鉄= 結合状態に数算して2-4億のメンバク製パンドがカラムから取れた。 5%-12分類配子がを用いてNatiodSO,-PACEを行い、

Makey, D. C. and Seef, U. S. (1978) Blo <u>chim. Bloghys. Acta</u> 452:250-256の方数 の保護機(Brown-Mason, A. and Woodworth. R. C. (1984) j. Biol. Chem. 259: 1866-1

タクス) にはってウレアーPAGBを行った。 III Cmにのガラスカラ よ (LKB) 中の6-50%スクロ=ス気配上でり 8%のをharm alvie、p計5-8 (Pharmacia) を用いて紙点製菓店製 を行った。カラムは1000Vにて2m人の長枚電流に純菓子編集中を et.

6.2mi中の契料を当配の単ばから回収した5mlの密数で希釈し た。その後似料をカラムの姿态度領域に再注入し、単中を2分析関係け た。何所もカラムの底から1、5mlの両分で無めた。各部分をAges 氏びゅ Hに関して分析した。最高 A sesを有する部分を、アポー系が統 - 瞬間タンパラ質のple系すとして表現した。

株は、1mMのNTA、1mMのEDTA、6、5Mの砂礫ナトリウ ムを含む坩埚液、口行る、ヨ中でインキュベートすることにより、軟ー タンパク者から安容に設定できた。アポータンパク質をCentric on [O (Amicon)上で長小神様に講修し、その様本を築いて 2回、及びG 1NのKC!を知いて2回効料して再連絡した。アポー ◆ とはり毎日は東海が水の土を原原があるが、0、1 MのドC1 中に発 魚と形物はした。マボーオンパク質を辿り出るの。他で手引用品とし、 4650mで感収を配送しながら高した遺伝のドゥ(料TA)』で展定 LA.

総み替え五丁F/3Nの定量的先度機震。 動作の関係免疫検定を用 い、精製の様々の夜階で給美板中の組み替えれてド/2Nの護康を辞録 th (Foster, W.B. et al. (1982) Thromb. Res. 28:649-661)。タンパク質分解-調準Pe-hTF /2N (Lineback-Zins. J. and Brew. K. (§

988) J. Slot. Chem. 255:708-713) +104 ogen (Plance Chemical Company) を用い て放射コク表化し(Frakor, P. J. and Sceck, J. C. . Jr. (1978) Biochem, Siophys. Res. Commun. 80:849-857)、排体をして用いた。モノクロ →テル銃=もTP抜けであるHTF=14キブローデとして用いた(B artsk. J. et al. (1984) Folia Bicl. (P engue) 38:127-140)。この杭体はカモアのブミノー泉 頻楽出窓のみを認識し (Mison, A. B. et al. (1988) Br. J. Haemalol 68: 882-393) サントランスフェ サン会理数しない (Penhallow, R. C. et al. (i) 86) J. Cell. Physicl. 128: 351-260).

<u>アミノー米鉢配列分類</u>。 総み替えちTF/2Nの非主要指導及び芝 表形型関方のアミノー宗権配列をUpiversity of Vor montodiven Analytical Pacifityst Applied Blosystems 470A Protein Saquencer上で決定した。

通ヨー実験ーシック集会。 堪み替えたTP/2N中のオリゴ路の存 在を、タンパク質を過ぎ一番数一シャフは高で発色することにより決定 Ltz (Fairbanks G. et al. (1971) Bioch emistry 10 2005-2017).

<u>被協携的環状ペットル</u> Camille and Benry Dr evius NMR Laboratory, Department of Chemistry, University of Vermo

赞美平7-502723 (7)

oticaijās, 872 Tesia Bruker WM NMR スペクトのメーターにて、京祝練店(quadralure dete ◇ ↓ ⅰ ウ π) を用いたラーリエ関連モードで横在してプロトン及びフッ 素にMRスペクトルを得た。**Pブローブはその係門のDォ、CA:i alopher W. Allenなより健康された。プロトンスペクト ルの場合、スペクトロメーターの設定は前記の過うであった(Valc our. A. A. and Woodworth, R. C. (1987) Biochemistry 26:3120-3125) . "FX<9 トルの確念、基別幅は30、000日とであり、アケイツション時間は り、275秒であり、77イジンコンと18、81m(98% のべん スの際に2 目外のレシャバーチレー(resiever delay) が介在し、材料は308*Kであった。ロデ化サンフトは7月2日中の0 1Mの菓ファ化酢酸に対する。テンパク質試料は8、1m上の質量、8 双子光*II₂O中の6 - 8mgであり、スペクトルは*目±0を含む排物的 5mm NがR物に挿入られたも、1mtのカブセル中のこれもの動物 につき走査した。**ドスペットルの急由誘導頻数(1mae indw o tion decay) につき、フーリエ製造の前によりHsのライ ンプロードニングを行った。

M TE

<u>ヒトTP CDNAの地</u>原、ハイブラッド開放プロープとしてとト TP CDNAの5⁵ 税所への24機能デリゴラシルデドを用い、ヒ ド開催のDBAタイプラリ(Prochowoik, E. V. <u>11</u> 1 (1983) <u>J. Stol. Chem. 258</u>:8389-838 4)の約100,000度の200-年27リーとソリルと、1歳の組

<u>col</u> のでありび18を別の複数をが選択を対象にし、SV40 mm プロキーラーにより形実を扱いたという直接シアクラーゼ (DHF表) SDNAの開発を集死に対する場合を可能にすることが会まれる。DH F表 のDNAは、他分別等例とトレルモート (MM) に対する報 切かが210 ー治が、組まなの形式対象とラードする (Shmonse A. and Lovinson, A. D. (1983)Pros. <u>Hafi</u> A. colset, USA <u>Ø</u>: 24495-2499) これは、トランスフェクシッとなれが指定をあるに某時度 (0. 5mM) の付すとでは中華中することを可能にし、DHFRの不良した実施

ベ2ク 機能及び独立 2番の郵収等止コトン及び1種のHind ill要素料を設ます。 (2014度料の712 - 最近がみがまかしま 電子メイン時効クラクー機は、は745 アレジチドー間の実施契数 関発により等人した。この機能性のもの常定質数を別は、回動計す 書き付け乗取にはいるまつ、237 で終わる (40 c G | | 1 i r r r r 7、 R. T. A. a.f. ±1 (1983) <u>3. P r o l</u>, Chen. 235:38 (3 - 2 5 5 3).

製造ペクテーのMUT(Palimiter, R. D. <u>e.f. a.</u>] (1 887) <u>Cel.</u> (Cambridee, MA) <u>20</u> (435-443) はマウスノタウチオネイン・1/E は海条から少速を対象的を含 これは影響器やつなにかいて集めまりは成本から少を開かました が表れな(Paliter, R. D. <u>e.f. a.</u>]. (1987) <u>8</u> <u>Citate</u> (Washington, D. C.) <u>222</u>: 500-8 14)、このペターの信息は触り用性には、マウスメタロデルよく ト.170キャライルを配置のお客でもの人数を実施事業と 1.70 × 2.70 × 2.70 × 2.70 × 1.70 × 2.70

スフィッションし、所られた等質性病性を以下Xの円在すて選択した。 トランスフィッショとはお日間に関連により制度をおけな回れる時 不知の分割でんがは、ロルステルドレでの立ちつフガロースアル上で 全区へら電視系数が中で、付きの1 a s i s で、41 a d (1 882) Mentall Cold Spring Harbor Lab ので1 tory, Cold Spring Harbor Ny)。二 トロセルロース上に呼じたは、ハイブカッド形成プロープとしてもGH 機造するは、戸屋的環境に対するよりブルタンサイドに対でカット 予算人は、トランスクタンとは内面をで約、はたら機能 場合いるが大力を対してい、成功・前等日は実際を対しませなかった (データが成していない)。これは「GH で 1 ppsmmで対象が (イン 実際をなりにアラフィーステルとなった。)

正常年齢者れたり以外側により表面されたがペップトでの点が点 がに、借りの側能声の場合くの一ト及び自然の時方とのものようが プロトラが使用テル(第2)、自様に細胞、わらリーコがリナル ストドをはり目状態態及が出下イクトーをいしてプラストドを載り 料比が確認が出きし対が(日井下神)とりがは、側面が無路によした の地面がはをはれているできまった。側面が無路によした の地面がはをはない、細胞子であれてより、一部のとした。 ことのでは、一下を調料なびたルギリン・部分と「カルのはれる病 にといる性、トル・カートとで、(Van Oose, 5, 人・ましまし、(1986) ま)のとかってです! りょう! を1:599~105)。

h T アン2 N生成物の等質性は、SDS - P A G E Lで開始タイキー ト及び分泌取得が対抗的 J に関のングナル配列の終末の成功を作す。就 動物中にクシアアが同じんと提加ないので使一を選ばた I T F 新た物質 性が高いてとかわかる。

知能報で成当されるも下ド/2×向給等の大規律生養の場合、増増中のト下/2×の体度はサジャイムノアッセイにより設修して約10-15によどの1であった。

<u>関ラびたカキテノを中の影射及び特殊比</u> 網みがたカキテノをNを 3 映像後により特別し、それはラジオインノアッサイに思づいて3 0 % の環境の大変影響のタンパク製を目的的に与える。Polyanion</u>

TF/210m命の31は代れる代表: 83U5. 4でかった。 成立形成で変形が多の所が156を元人でディ240で11~当時間 別分式: 加減からのホートTFの間を保い付金がは配金的一つ 指列を当れて(M+cOillivity, R. 7. A. <u>c.</u> ± <u>1</u> (1983) <u>1. 円101 Chem. 25</u>G:5540-8553) (数1)。

組み様メッパの図の方面トンMMRスペラナル(図る) は、タンパフ製物率、均隔れてアン2Mのスペラトルを持ちに従い。(1987) 同のはこれ、A. and Woodworth、R. G. (1987) 同<u>したためにませまでに対</u> ②E. 3120-3123)が、転金砂火・ アンパラ質の製金の方が利用知知解し、m・P・P・P・P・MWに力能 地上で成月した関地を関加から利用したフィッカが「F. NMRスペ ラトル(図5) は、4つから対応変量上次対象が下、人の世かを令く マの初からかで、も行きる。

整1 とトトランスフェリン及び組み替えたトトランスフェリンプミノー末端 ポー分子のアミノー末端配列

カンパク質	71.7分配門	食規
ヒト由海	Y-P-0-E-T-V-V-X-X-C-A-T-S-	MacGilliwrey
トランスフェリン		es ej. (1983)
組み替え	7-P-p-F-T-7-R-T-3-1-V-5-	本製造
hTF/2N (15	E)	

SI上の場所が開始は、ウレア・PACE (図3、145×C)により 開送される品の、タンパブ目の自立呼吸からにさが)気で受け扱う。 3、パネルが、の気のブモー及技術・他物形態を党重が可能した。 ウレア・PACE上である解析の「レジドロデモ・ロ下ア・Z NTA り、特別の扱いパントロデェートア・Z NTA ちことに記念してはし、 は、505 ― PACE から (図3、144×8)に、正規関係とは表面 形態の色が個えれてア・Z NFA に、正規関係とは表面 ア単の色が個えれてア・Z NFA に、不可能をは、ま程関係とは表面 アルストロドル・ア・フィース・ア・フィース・ア・ストロドル・ア・ストロ・ア・ストロドル・ストロドル・ストロドル・ア・スト

組み替え 7-9-5-3-5-7h T F / 2 N (非主義)

・図の形式的下ア/2列度付は、Applied Biosysism s 470人 タンパク度シーテンテー上で物度した。約200をキルの後期期を分割した。712シーケンサーサイクルを分析した。サイタルやで選ば付別とされてかった。しかし分析の前にスティン域無は維持しなかった。16シーケンチーサイクルを必折した。

組み替えDNA声を描いることにより、いくつかの絵立した高速で何 能してサンパク質分解により携きされた様と同一の概念を架すり下Pノ 2ドタ子を対金する。これは、この漢書な機構法クンパク質の機能的指 性彩通の、受容な構設体養等における表質の初めての概念となる。

本文に総約の別以下に思って、自下アノフ州場により、のドドな一 不認物面及以下点を対し物場面を必要とせている面の場合をとかって プロが起きされた。自計ド陸四位程の対決性性度につか過じており、 製造かせるイイメリファラー電影中の影響を見た力のまずはから気候中で ある。取り、トルの影響を自する部は原工り設計室のいずれかを向いる ただしたり、投資素質のランパケ質を必要していませれがあるような 方面にコモナラな組み組まったが実験をあたが減することができる。 Pollanion 31上での制みれたある事とがの時の行れた。 アンターストラントラントの影響をありませい。(因う、バ エルモ)か、SDSーPAGE (関3、パキル目)上では促進度である。 ほって提出りの分子割が同ってかるからいいフサルの変化の時間が表 はって提出りの分子割が同っているからいアセリアを見たの情報が表 を対しています。

も存動の遠い種を象すことに注意してほしい(図3、パネルロ、潜分g 75 (7 to) ..

これらのゲル上でのアセートキア/2Nによるアポートエデ/2Nの 円染及びその単は、FPしC男分の収集法、フレアゲル上における総合 終めいくらかの場矢、及びFPLC飲料の社上げの陽の再級飲の締合か ら生する。周一の以一果始配列(表え)は、シグナルペプチドが存主要 及び主要形態の切み替えタンパク質の同方から論表されたことを素す。 たり由液からのカマド/2Nの場合と関係に(Lincback-2) na. 1. and Brew. K. (1980) J. Bioj. Che 型・255:708-713)、組み替えれてF/2Nロボーグリコン **ル化である。トアピノ2Nの主管形態為び未実要局態の差の程由は現在** 未知である。表生要影響は合併の組み替えタンパク質の5%以上となら ず、清坊1%以下である。従って場分数組み替えれてアノ2N(空敷形 粉)の単数の目標は埋成された。

組み替えりでき/2Nの鉄結合部略、p l 、N z D o d S Q ₂− P A GE及びウレアーPAGE上の移動、ならびにプロトンNMRスペクト ルは、ナーモリシンを思いたタンパタ質分析によるアミノ党権もTP一 終から誘導されたもでドノ2Nのものと、上記の点を強いて十分合理的 に一致する(Linebsck-Zins, J and Brew, K. (1980) j. Biol Chem. 255:708-713:Va Icour, A. A. and Woodworth, R. C. (198 7) Riochemiatry 26:8120-3126), 90% **ク質分解により精準等れたト午ド/2Nより里野形態の総み替えタンパ** ク制は単分数性が高く(服3)、そのプロトンNMRスペットルだおい

花の特勢として思いた(図2)。PCRグライマーとして問いるために 2別のオリゴミクレオチドを会成した。オリゴミは、Rの11日的年か をコードし、トドドの天然のシグナル紀列をコードする配例が続き、ア ₹ノ酸334-341のコッド税列と合わさる配列が終いた。物2の水 サゴヌクレオナドはちTP cDNAの3、非額配価額の物物はとから 8り、正常な調飲存止部位にSmal証券を刊る。を導入する。(Ya ng. F. et at. (1984) Proc. Nati. Acad クレボチド2125~2127)。 Taz#リメラーゼ (perkin Bluer)を用いた25窓のPCR連幅は、希望のDNAフラグメ ントを与え、それはもTPの天然のシグナル抑制をC無由がっ」と呼ば にスプライシングする。このフラグメントをその後ちゅっ!や知るま。 hTF/2N表現研究の場合と向機によれり下の大Smalフラグメン まとまれした.

111. 組み替え会長トランスフェリンの製造

ヒト血清トランスフェリンのためカコード批判を、止収のとト齢違う イブラリから単数した全~及くDNAケローンから試練した期間検索点 ルフラグメントから切み立てた。 最初のクローンの基とせるプラスミド 〈p ※ T - 2 j ※) のユニーク制限研集認識部改の数が限られていたの で、維持すべクター中にコード配列を挿入するために一番弾のクローニ - グ音能か必要であった。この選擇は、c DNAの5 * 末悔からのH p ali/BamHiフラグメントのベケターpむC18へのクローエン グにより開始された (Mersing. 1. (1983) <u>Meib. E</u> 23.5 mc 1. 161:20-287. #6427521 F&Bamil

共鳴線を承す。非主側市部の量はNMRによる分板には不や分であった。 2. こうしょからのアルカリホスフェターが出へのローフルナロモロ

シンの特人の以給の研究は、タンパク質やのチロシルを発わぬ目のに何 査するための™F NMRの有効性を確定した《Sykes』B. D. 41 al. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 71:469-473: Hull, W. C. and Bykes. B. D. (1974) Biochemistry 13:3431-3 4 3~)。現み替えトTF/2NΦへのロードーチロシンの挿入により。 この経験施養系において名詞的アミノ敬能後が可能であり、チョシル気 個の動具的NMRプローブへの方式を与えることが取出された。このは、 料は第一面換班を得え体に関して上記で記載した通り、ホー単的なりは ク書とすべての点で同様にお覧する。多葉の挿入の追収のために取称事 養条件を患適用した場合、制造性及び反映性会院を禁御した時、及びロ 列を製化をせた時の**F NMRスペクトルの変化は、企画結合に修興 的に含まれるチャンル技術の研究に有用であるう。環状的にジョーテリ ウム代した野野族でミノ酵の仲入は、西本ツズラからのサゾチームに関 する研究と関連の方法でタンパク質のプロトンNMHスペクトルの芳香 高領域の分析を可能にするであろう(8rgws=組ェミゥぉ、 A. 生 t al. (1981) J. Biol. Chem. 256:1506-1569).

11. カルボキン製館製造器を含む組み替えトランスフェリン単一分子 A 1998

h T F のカルギキン突迫部のコード配列を含む B c o R 「制電フキグ メントを、金乗れてF. cDNAから単離し、PCR-指示姿勢症症機

1及びKindlTで活化し、ヒトトランスフェリンとDNAからの BamH(/Hitdiiiフラグメントを表謝のフラギェンもに加米 してグローエングした。困られたプラスミギをその後Hindiii及 びPstiで病化し、トランスフェリン cDNAの3' 支端からの書 終的Hindllll/Pstlフラグメントモクローエングも、金一枝 コード配列の組み立てを見てした。Min B びらっまはトキンスフェイン ギー分子コード配列の場合に記載した通り、得られたプラスミドを5 a c 1 款びSph I で消化すると、1 何の制限フラグメントとしてなった コード配列を放出し、続いてそれを下す DNAサリメラーが及びすり 下Pを除いて早時化し、その後のNUTの大Smalフラクテントにク ローニングした (Paimetor at at (1987) Cal 1 50:435-448),

プラスミドDNAはE. coli JM105から規模し、塩化セン ウム勾配を鳴いた2連載連る段階により振動した。 ペピーハムスター 特硬 (BHK) 植物を、10%の中植児自身を含むfluibeccoの 僚正巳aa1e培物-Hsm'; F-12张模剂混合物(DMEM+ f=12) (Ciben: Sirmal #7100-mm@Hibens 10'細胞に成ねし、挽いてSearte, P. F. <u>et al</u>, (1 385) Mot. Call. Bioi 5:1489-1489に記載 のリン触のルシウム異次治により10cgのブラスミドを描いてトラン スフェクションもな。24時制能、活動を500gがのメチトレキャー ト (MTX) を含むDMEM-F-12に変え、ブラスミド会理解例が 考訳した。表訳したら、8DTA(8、2gm/1)を含むサン部出述 新食塩水を用い、転飽を約30%の塩密度にて5個の100mm能に、

特米平7-502723 (10)

そのは5月の下~178フラスコに、素体に多様の位金部属回転値(そ れぞれ200ml)に低度にあ過ぎせた。下~178項通の標に、フェ ノールあを含まないDMEM~F~12中のウンビを単端向のれわりに修

構造性、リリミアコミロ「 G (ジョンの) 名 (新の数ではいた。
1 原生充臭が取らべると (約) 0 の エアル 1 物物)、 U (I に ル 。
ロ 「 G を为立せい物性がなくとも 2 想象表の形。 退分 報え チンパラ
同か 都を経行でる ちことが思いてされた。これは疾患をおた。 届の 4 がれ と 1 治療 1 シップラン リンの 3 間 を 5 かま に 即 年 し た。 福の 4 は テンパラの 3 間 第 の 2 の 2 の 3 で 1 かま と 1 かま と

しく肉熱電異体トランスフェリンの製液

スペクトル比略力せる。

野塩製(木油)の製造の検索の単一文字でくり放起号。それに触いて 一次配列中の環族の故障参写、(この構造成為タンパク質のパリンを能 関1と概定する)、及びそれに終く準体体系の経費を扱いることにより

単分数であり、特別ヒト位置トランスフェリンを国際のスペクトル及び

國情與然從其体を指定する。別えば位置83のアスパラボン微院差がセリン残酷により関係された変異体は、ひら35と指定される。

金市TF/2013-FERFANISms) 5(セップシャーコングし、 も可能性化をリゴラリセボドー等の実施実施を (2011年、 M. J. and Smith, M. (1983) Mg.th. Engym の1. 100:435-600) の即型として限い、会はい、いので、 報告を(Kunhet), T. A. (1985) P. p.s. Neil, A. (2d 5c), USA 32:488-493) を形できたより、 重要商品実施は658、D5JC、K2650次刊2071を報告 位よ。実施業施展の成り、実施が基準の大きのロップとして経行。 位と、実施業施展のの、実施が基準の大きのロップという。

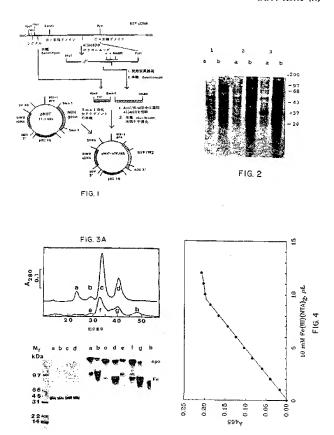
50ヵの関係でコード配列の終るに始って間的機能した配列決定プライマーを称いたグライキン説門分別により取扱した。その他所変のコード配列を、制限消化により取扱し、平消化し、前記の適りpNU丁中に伸入した。

よ) 3 ― 年 にも知り クラスタリン (九千戸) 近世的) アミノー会 物中の子子 (九千戸 / 2月) の様々の検定部のの資料を実施的ための。 ひれた者がひがりでプラスト(タ州電きされた。たれのか先支資料は、 1) とドイラノフ、リシのビー系操制が比多される大元に収える野鮮に 可におづくりらるる。 2) 実現の老市からのトナアのビー本理学のは からのされたランスフ・サン (ロチド) 中のビー本理学の可能が 大元におづくた 20 年以、の)とサンリン (九七丁で) 中の理 大元におづくた 20 年以、の)とサンリン (九七丁で) 中の理 を入るだめたしてのひちづとを受け、これらの種類的はすべてベビール よフード (本版をの変えせる対しまりので、19 ―10 日の目の目のも オステード (本版をで実現された。おりで17 下のための含までりわみた プリンドフターの「デアノスターのドアノスターのドアノスターの ロカドア・スターの「アアノスターのドアノスターの

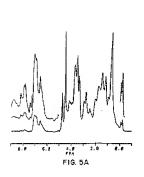
申電報のの地大実施もの物技により83条実施機関は特定を含む まか (天地中のは高い区して) 可達到テンパク資よカマッと得かのであ ることが変まれる。利えばこの実質質量和は、3かケッドを走むすんな ビッシにおける電気場合にてその物合がを今らが、可能型はその結合数 を受替している。可能スペラトの他身が4名22mmよか、野生型 イフnmのより形である。435条実施を重要は、野能型はより終生の 総合制化、470mmに開発スペラトルの最大を対する。K80BQ 環境管理は、その代表であるTF/8Cと同様に存実認及のデ 施しく他と始をする。地変態をプレジを取の無性、それをもれれが の名DTA及びNTAを含むり、る料準物理等所、2月4、9中で 地と始ば加えるが、現代を別は金く他を入わて、その始終れを始 できためにはらせるよびにががファッキャンンが必要できる。7寸 一変態等が当に、我もの可能を研究とアレジをより遅いようでもよ。 この現態変別が随きの可収スペアトルの表示は460nmにある。 全面はかせまった。 企業が関係があるの収えペアトルの表示は460nmにある。 全面はかせまった。 と記載で対象がある。

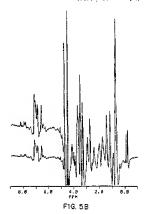
・ 国家協会はあたらける助達がは、かまに把款の特定の方法に関する参数の 別等物会は高的実験のみを用いて認識する。又は確かめることができる であるう。そのような図る物は本美学の範囲内であり、以下の美史の総

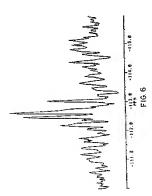
窓に含まれると考えられる。

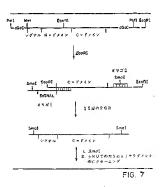












特 寄 年 7-502723 (13)

所正省の写し(翻訳文)変換者 (特許法部184条の名) 平成5年8月6日 [24]

特許伊美術 麻 幸 一班 製

1.特許出額の表象

PCT/US92/00928

2. 発明の名称

紹み替えとウンスタェリン、トランスフェリン単=分干、 及びそれらの突起変異体

3.特的浪顺人

近 双 アメリカ合衆国バーモント州の5405パーリントン (番地4し)

ず・ユニバーシティ・オブ・バーモント・アンド・スティト・ アグリカルチュラル・カレフジ (ほかし名)

4. 代 多 人 〒187

G: 用 東京都港区赤坂1丁BG参15号 日本自作單台版

A 6 (6078) 中華生 小 田 長 平 音 3585-2256

5. 補田県の機助年月日 1903#5548

5 **200 200 00 00**

()) 補充者の写し(前柄文)

1 2



特礼間トランスフェリンのアミノ京場を含む英記銘をは別に基本的

に哺乳類トランスフェリンのカルボキシル実現を含むな小如本会れ、展 毎町居住トランスフェリンギー分子。 2 少なくともキランスフェリンの1歳の安造部の金属一結会ドメイン

を含み、他の突出形の金属一粒合ドメインを含ます。双怒を異なかる国 に対して実態の哺乳類トランスフェザンの結合力より強い結合力を有す る、機能的器能完成変異体哺乳類トランスフェリンボー分子。

3、数に対して天然の哺乳類トランスフェリンより強い結合力を育する。 請求の範囲でに影響の奥地変異体トランスフェリン半へ分子。

4. 少なくともトランスフェリンの主任の英田邨の金銭~組合ドメイン を含み、天然の哺乳類トランスフェリンの位置で自らのリシン放棄がグ ルタミンはより産業されている、施水の転回3に記載の樹糸を見法もつ ンスフェリンギーのそ。

5.少なくとも哺乳類トランスフェリンのカルボキシル末端を含むトラ ンスフェリンの1個の製出部の企業ー行力ドメインを含み、他の家出版 の会演一組合ドメインを含まない様表像トランスフェリンの健康的活体 半一分子を全国の福港権を開発集以下に下げるのに十分を表で含む、企 属キレート化治療で用いるための治療を組成物。

6. 金属が終である、確求の範囲5に経験の指数的総統領。

7. トランスフェリンギー分子が天然のトランスフェリンより厳しく金 薬に飲みする事業を享任である。環境の範囲をに記録の会管的知点の。 8、トランスフェリンドー分子が突然のトランスフェリンのリシン技能 の状わりに従業208にグルクミン液器を含む、純文の範囲?に肥恕の

١.,

b) 保限されたトランスフェリンを開発することによる形体を共 た。基本的に他の特別類タンパク質を含またい維維的媒体的を何ちゃし スクェリン。

故事的称的数.

- 9. 他の哺乳類タンパク質を含まない破筋的液性哺乳類トテンスフェリ ンの海太的に発覚な四部位.
- 10. 他のヒト血溶タンパク質を含まない数~場合とト血液トランスフ ・サンの基本的に基盤な細胞を
- 11. a) トランスフェリンをコードするDNAを含む各個ペッタール 用いてトランスフェクションされた真似細胞を、トランスフェリンを希 捉させる条件下で略奪し、
- b)発現されたトランスフェリンを顕現する最階を表む。無動物 苦性哺乳部トランスフェリンの製造は、
- 1.2. ベクタ=がプラスミドゥNUTである、種状の報題1.1に記載の
- 13. 奥技術能がベビーハムスター脊椎動物である、対抗の範囲11に 17節の大き。
- 14. a) トランスフェリンの株理可能プロモーターに作扱的に結合し な、トランスフェリン交はその一部をコードするDNAを含む物理べき
- ターを用いてトランスフェクションをれた異技趣物を培養し、 b) プロラーターを被逐してトランスフェリンの身種を採案1...
- こ)取収されたテランスフェリンを回収する政務を含む、機能的 **送性哺乳類トランスフェリンの製造権。**
- 13. プロモーターが亜鉛製造可能メタロチオネインプロモーターであ る、純水の範囲ませに記載の方法。
- 18. a) 対象の範囲12に記載の発現ベクターを伴いてトランスフェ
- マションされた直接回路をトランスフェリンを発表を安る条件下で消費

		•	2 14 2		Assume w. I	
0.00	14.65 17	a complete and	-			ded and
				PROPERTY COM	THE POT SHAPE	.,
100	1, 6,41	31/92. C elk 32/4				
e. 101	de ecan					
0-10	-		Secret Come	PRODUCTION I		
ws		55 676 . \$30739			2	
		Catarian or Country	de non Care	one objects	reduction Contacts	incress*
2007. 2007.00 1 her pa	DIALOC:	occurre, mane coduction, per in process, fur	tical ion.	VECTOR.	TOP CAPTE.	Character in
H 40	the Mark	COMMOPPING TO SERVE	DWG"			
		e el Bassione, ^a pro-es		*K*** # 10 10 1	Court Strings of	Report across "
ĸ	tope type tares	person, bolives i respon of the Seren france transfaction of that, ste seging	Arting-Termi	Ind Rest	Political of	2.4
x	37000 1880 97149 3512	t of Michaeles 1 JS March (95) D. Structure of 1553, see sector	Case per 4 T A Pa Turen Stro Concreted	obstieres	250. mg. f. 25 st 'The STIR', pages	3-3
#/T	1 Proc	Transferrie Co	m III, esem	Proper coal Prope	net of Schan	1.45
b. •	OS. J	. 5.836 691 cgo a J. lines ep-32	eng golym	1 25 Ju 1 3. 16444	ne (195), see 10-52-	1. 1
7		10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 1				
			1000		dot if the	
				1.1110	orden mittelieren	DEALERS SACRE
give in		Committee of the colors	rim terri	Dree 92	1877 93Z	r Serer Ferei
	ATEL					
10.000				Calman	CHANGE OF THE PARTY OF THE PART	MA.
51	12/05			540(11)	L BATSIANY	
Ferry PC	115177	learning stay It's No. 17	415			

PAPPER					
	R APPRILL HOLE CANDING OF	tan tul escana e	नद"		
				1	
				i	
	j				
	Ì				
νП.	High at one week comment		STREET,		-
In man	Spirit and analytical party.			I I Government	-
· a				***	
. n.		rac maraw			
				-	
٠٠٠	PCF No. 1 (p)		X1-7		
	Part No. 1 (1)				_
n (3)	AT THE PARTY WHEN THE CO.	WIED TO- 15 14 01	No.		_
n (3)	rece App a light Staffy & Storie Works & Sector or	WIED TO- 15 14 01	No.		_
n (3)	AT THE PARTY WHEN THE CO.	WIED TO- 15 14 01	No.		_
n B	PER PARK BUT THE WARREST THEFT OF THE PARK BUT THEFT OF THE PARK BUT THEFT OF THE PARK BUT THE P	WIED TON 15 (4.0)		T II WHAT	_
	PART NA COLOR DE L'ARTE DE	WIES 100+ 16 14-01		- 11 mm	
	PER PARK BUT THE WARREST THEFT OF THE PARK BUT THEFT OF THE PARK BUT THEFT OF THE PARK BUT THE P	WIES 100+ 16 14-01		- 11 mm	
	POT AND SQUARES SAFETY OF THE	WIND TO 15 14 OF			•
	MATERIAL SIGNAL STATE OF THE STATE OF T				•
	POT AND SQUARES SAFETY OF THE				•
.0.	MET BASE 1915 MET BA	100 March 10		AND THE PERSON OF T	
· 6	MET PALE 1919 MET PA			AND THE PERSON OF T	
.6.	MET BALL SIGN MET BA			AND THE PERSON OF T	

PANTA MARININO (SPANJE) PROLITORINA 19193.

TO CONTROLLED (SPANJE) P

フロントページの統合

(51) Int. Ct. *		識別記号	疗内整理番号	FI			
C12N	15/09	ZNA					
C12P	21/02	ZNA C	9282-4B				
//(C12N	15/09	ZNA					
C12R	1:91)						
(C12P	21/02						
C12R	1:91)						
			8412 -4B	CI2N	5/00		В
				//(C12N	15/69	ZNA	A
				C12R	1:91)		
(72)発明者	フアンク、	ウオルター・	デイ	(72) 発明者	メイソン,	アン・ビ	:
	アメリカ合衆国テキサス州75243ダラス・				アメリカ含衆国バーモント州(05445シヤー		
	アパートメン	ント2202・オー	ドリアロード		ロッテ・ノ・	-スグリー	ンプツシユロード

11991 (72)発明者 マツギリプレイ、 ロス・テイ・エイ (72)発明者 ウツドワース、 ロバート・シー カナダ国ブイ 6 テイ 1 ティ 7・ブリティ ツシユコロンピア・パンクーパー・アリソ ンロード2233・アパートメント807

ロツテ・ノースグリーンブッシュロード (番地なし) アメリカ合衆国バーモント州05482シエル パーン・ローガンレイン4